



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12Q 1/68, G01N 33/58	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/22164 (43) Date de publication internationale: 20 avril 2000 (20.04.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02517 (22) Date de dépôt international: 15 octobre 1999 (15.10.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/12957 15 octobre 1998 (15.10.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): GENSET [FR/FR]; 24, rue Royale, F-75008 Paris (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): CHERIF, Dorra [FR/FR]; 11, rue Raymond Losserand, F-75014 Paris (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regim- beau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(54) Title: FLUORESCENT PROBES FOR CHROMOSOMAL PAINTING (54) Titre: SONDES FLUORESCENTES DE PEINTURE CHROMOSOMIQUE (57) Abstract <p>The invention concerns fluorescent probes used in multicolour <i>in situ</i> fluorescent hybridisation methods, and principally chromosomal painting. The probes designed for marking a chromosome, are such that they consist of a set of DNA segments more represented in certain chromosomal bands and are obtained by IRS-PCR amplification from said chromosomes using PCR primers specific of the repeated and dispersed DNA sequences Alu and LINE. The invention further concerns methods for producing said probes, multicolour FISH methods capable of using said probes and diagnosis kits comprising them. The invention also concerns combinations of fluorophores and optical filters.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne des sondes fluorescentes utilisables dans les méthodes d'hybridation fluorescente <i>in situ</i> multicolore, et principalement la peinture chromosomique. Les sondes destinées au marquage d'un chromosome, sont telles qu'elles sont composées d'un ensemble de segments d'ADN davantage représentés dans certaines bandes chromosomiques et sont telles qu'elles sont obtenues par amplification IRS-PCR à partir desdits chromosomes en utilisant des amorces PCR spécifiques des séquences d'ADN répétées et dispersées Alu et LINE. L'invention comprend, en outre, des procédés de production desdites sondes, des procédés FISH multicolore pouvant mettre en oeuvre lesdites sondes ainsi que des kits de diagnostic les comprenant. Enfin, l'invention comprend des combinaisons de fluorophores et de filtres optiques.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

SONDES FLUORESCENTES DE PEINTURE CHROMOSOMIQUE

La présente invention concerne la peinture chromosomique et plus particulièrement les sondes fluorescentes utilisables dans des méthodes telles que la méthode FISH ("Fluorescence *In Situ* Hybridization"). L'invention porte également sur des combinaisons de fluorophores et de filtres optiques.

L'hybridation *in situ* est une technique permettant de détecter une séquence d'ADN (ou d'ARN) au moyen d'une sonde de séquence spécifique homologue à celle étudiée. Elle est fondée sur la complémentarité des nucléotides (A/T, A/U, G/C) et elle peut être réalisée en conditions physicochimiques précises sur des préparations chromosomiques ou tissulaires. Le résultat du processus d'hybridation *in situ* est la formation d'un hybride entre une sonde et une cible. L'hybridation *in situ* inclut une étape de dénaturation et également une étape de détection de l'hybride ou de la sonde qui est réalisée après l'hybridation *in situ* de la sonde sur la cible. L'échantillon peut adhérer sous forme de couche à la surface de la lame et l'échantillon peut, par exemple, comprendre ou contenir des chromosomes individuels ou des régions chromosomiques qui ont été traités pour maintenir leur morphologies sous des conditions de dénaturation. Dans le cadre de l'hybridation fluorescente *in situ*, les sondes sont marquées avec un fluorophore et l'hybridation est révélée par un marquage fluorescent.

Le développement récent de cette technique permet la visualisation simultanée, sur la même préparation, de plusieurs sondes révélées chacune par un fluorophore différent. Cette technique dénommée FISH-multicouleur ou multi-FISH a été rendue possible par la combinaison de filtres spécifiques des longueurs d'onde d'émission des différentes molécules fluorescentes assurant le marquage grâce à une imagerie assistée par ordinateur réalisée au moyen de caméras CCD refroidies de haute résolution sensibles dans l'infrarouge (Schröck et al., 1996 ; Speicher et al., 1996).

L'utilisation de sondes présentant une séquence spécifique homologue à une séquence chromosomique précise ou un chromosome entier couplé aux potentialités d'un marquage fluorescent multicouleur permet de développer des techniques dites de peinture chromosomique, c'est-à-dire d'obtenir des chromosomes de différentes couleurs et ainsi d'obtenir, si cela est souhaité, un caryotype complet multicouleur. On entend par caryotype, l'arrangement caractéristique des chromosomes d'une cellule à la métaphase.

Au sens général du terme, on entend par "marquage" une entité telle qu'un isotope radioactif ou une entité non isotopique telle que des enzymes, la biotine, l'avidine, la streptavidine, la digoxygénine, les agents luminescents, les colorants, les haptènes et autres. Les agents luminescents, selon la source d'énergie d'excitation, peuvent être classés en radioluminescents, chimiluminescents, bioluminescents et photo-luminescents (incluant fluorescents et phosphorescents). Le terme "fluorescent" se réfère en général à la propriété d'une substance (telle un fluorophore) de produire de

la lumière lorsqu'elle est excitée par une source énergétique telle que la lumière ultra-violette par exemple.

On entend par "sonde de peinture chromosomique" une sonde ou une composition de sondes telle la composition de sondes de cette invention, qui est adaptée pour hybrider, sous les conditions d'hybridation, avec une cible qui comprend un chromosome prédéterminé d'un génome multi-chromosomique. Si seulement une fraction d'un tel chromosome est présente dans l'échantillon subissant une telle hybridation avec une telle composition de sondes, alors cette fraction s'hybride et est identifiée. En pratique, une sonde peinte de cette invention peut être mélangée avec une seconde, une troisième, etc. pour permettre le marquage et la détection simultanée des deux, des trois, etc. chromosomes prédéterminés.

La visualisation de l'ensemble des 24 chromosomes humains a été rendue possible par l'utilisation d'un marquage avec une combinaison de fluorochromes. Par exemple, dans le cas de l'utilisation de 5 fluorophores différents, 31 combinaisons de fluorophores peuvent être obtenues. En utilisant ce principe de marquage et 24 sondes d'ADN spécifiques de chacun des chromosomes humains, il a été possible de visualiser chaque chromosome de façon différentielle. L'attribution, par le traitement informatique, de couleurs artificielles à chacune des combinaisons de fluorophores permet ainsi de colorer différemment les 24 chromosomes humains.

Rapidement, les fortes potentialités d'un tel marquage multicolore ont permis l'analyse d'aberrations chromosomiques jusqu'alors difficilement détectables par les techniques cytogénétiques classiques de marquage des chromosomes en bandes (Summer et al., 1971 ; Dutrillaux et Lejeune, 1971) (coloration au Giemsa, marquage au BrdU, etc.). Le principe de marquage des chromosomes en bandes repose sur les différences dans la composition moyenne en paires de base (richesse en GC) entre les bandes et sur les différences de compaction de la chromatine entre les bandes chromosomiques. La peinture chromosomique s'avère être un outil très utile pour détecter les aberrations interchromosomiques telles que les translocations, les séquences d'ADN amplifiées telles les régions colorées de façon homogène appelées HSR (HSR pour Homogeneously Staining Regions) ou les excès de matériels chromosomiques tels que les chromosomes marqueurs ou des chromosomes double-minute. Les aberrations intrachromosomiques telles que les délétions et duplications ne seront détectées qu'en fonction de la taille des aberrations, si celles-ci affectent la longueur des chromosomes, alors que les inversions chromosomiques ne seront pas du tout détectables par cette méthode.

Les limites d'utilisation du caryotypage spectral actuel en tant que tel sont dues au fait qu'il ne permet pas de détecter la nature des bandes chromosomiques impliquées dans un remaniement, inter- ou intrachromosomique. Pour ce faire, il est indispensable de coupler cette technique à celle plus conventionnelle des bandes chromosomiques (marquage R ou G) telle la contre-coloration au DAPI, la coloration au Giemsa ou à l'iodure de propidium par exemple.

L'obligation de combiner différentes techniques constitue bien entendu un handicap dans l'analyse des aberrations chromosomiques et, par ailleurs, l'utilisation de la méthode FISH ou multi-FISH qui associe le prix élevé de l'appareillage et de l'instrumentation nécessaire à la visualisation de la peinture chromosomique au prix élevé des sondes spécifiques des chromosomes restreint les possibilités de diffusion de cette technique auprès des laboratoires de recherche ou des laboratoires de diagnostic.

Des sondes de peinture actuellement disponibles sur le marché (GIBCO-BRL, Oncor, Boehringer Mannheim et autres) sont obtenues par amplification DOP-PCR utilisant des amorces PCR dégénérées de chromosomes ou de fragments de chromosomes isolés par des techniques lourdes telle le tri chromosomique par cytométrie de flux ou la microdissection de chromosomes. L'hybridation de sondes obtenues par DOP-PCR ne génère pas de bandes chromosomiques sur les chromosomes. La génération de bandes chromosomiques a été recherchée par l'intermédiaire de la création de bandes artificielles le long de chromosomes. Cette création de bandes artificielles nécessite l'utilisation de techniques lourdes et coûteuses. De plus, elle aboutit à des bandes qui ne sont pas des repères connus dans le domaine de la cytogénétique.

Certains auteurs ont décrit l'utilisation de sondes de peinture chromosomique obtenue par amplification de chromosomes par IRS-PCR (Interspersed Repeated Sequences) utilisant des amorces spécifiques des séquences d'ADN répétées et dispersées dans le génome comme les séquences Alu et LINE. L'utilisation combinée d'amorces PCR LINE et Alu pour l'amplification de chromosomes humains par IRS-PCR a été proposée au préalable par Lichter et al., 1990. Néanmoins, le marquage en bandes R obtenu par ces derniers ne permet pas d'assurer une peinture complète couvrant toutes les régions du génome, notamment les régions télomériques et certaines bandes chromosomiques G.

La présente invention a pour objet de fournir des sondes chromosomiques qui peuvent être obtenues de façon peu onéreuse et qui en outre permettent de faire apparaître directement les bandes chromosomiques de qualité sur les chromosomes peints dans leur totalité.

Pour ce faire, la présente invention concerne des sondes destinées au marquage d'un chromosome, caractérisées en ce qu'elles sont composées d'un ensemble de segments d'ADN davantage représentés dans certaines bandes chromosomiques et obtenus par amplification IRS-PCR à partir desdits chromosomes à l'aide d'amorces spécifiques des séquences d'ADN Alu et LINE.

Le terme "sonde" se réfère à un polynucléotide ou un mélange de polynucléotides tels que des segments d'ADN ou des séquences d'ADN sont associés chimiquement à des entités individuelles marquées. Chacun des polynucléotides composant une sonde est de manière caractéristique sous forme simple brin au moment de l'hybridation sur la cible.

Le terme "fragment d'ADN", "segment d'ADN" indique généralement seulement une portion d'un polynucléotide ou d'une séquence présente dans un chromosome ou une portion de chromosome. Un polynucléotide par exemple peut être coupé ou fragmenté en une multitude de

segments ou de fragments. Un chromosome contient de manière caractéristique des régions qui ont des séquences d'ADN contenant des segments d'ADN répétés. Le terme "répété" se réfère au fait qu'un segment d'ADN particulier est présent de nombreuses fois (au moins deux fois) de manière dispersée ou non dans le génome. La méthode dite IRS-PCR utilise des amorces hybridant avec les

5 séquences répétées dispersées du génome, comme, par exemple, les séquences Alu ou LINE.

On désigne par "génome" la copie complète et unique des instructions génétiques d'un organisme codées par l'ADN de cet organisme. Dans la présente invention, le génome particulier considéré est multichromosomique de telle sorte que l'ADN est distribué dans la cellule entre plusieurs chromosomes individuels. Le génome humain se compose de 23 paires de chromosomes

10 dont une paire XX ou XY déterminant le sexe.

Le terme "chromosome" se réfère au support des gènes porteurs de l'hérédité dans une cellule vivante qui dérive de la chromatine et qui comprend de l'ADN et des composants protéiques (essentiellement les histones). Le système conventionnel international d'identification et de numérotation des chromosomes du génome humain est employé ici. La taille d'un chromosome

15 individuel peut varier dans un génome multi-chromosomique et d'un génome à l'autre. Dans le cas présent du génome humain, la longueur totale d'ADN d'un chromosome donné est généralement supérieure à 50 000 000 pb. A titre de comparaison, la longueur totale du génome humain est de 3.10^9 pb.

Le génome des mammifères contient des séquences répétées d'ADN dispersées sur tout le

20 génome. Chez l'homme, la majeure partie de ce type de séquences est représentée par les différentes familles de séquences Alu, qui sont au nombre de 10^6 environ, et ont en commun une séquence consensus de 300 pb. Les séquences répétées LINES (ou L1) sont, comme les séquences Alu, largement distribuées sur tout le génome. Elles sont cependant moins nombreuses (environ 10^4). Leur séquence consensus est d'environ 6 kb. Elles sont préférentiellement situées dans les bandes

25 sombres G (G positives ou R négatives), alors que les séquences Alu sont plutôt situées dans les bandes sombres R (R positives) (Korenberg et Kirowski, 1988).

Les segments d'ADN amplifiés par IRS-PCR selon l'invention peuvent avoir pour source des hybrides somatiques, de préférence rongeur-homme, des chromosomes ou des fragments de chromosome. Les chromosomes ou fragments de chromosome peuvent être obtenus par tri

30 chromosomique par cytométrie de flux ou par microdissection chromosomique. Dans le cadre du mode préféré de réalisation de la présente invention, les segments d'ADN amplifiés par IRS-PCR ont pour source des hybrides somatiques rongeur-homme mono-chromosomiques.

Les segments d'ADN amplifiés par IRS-PCR selon l'invention sont davantage représentés dans un type de bandes cytogénétiques. Les bandes cytogénétiques préférées sont les bandes G ou

35 les bandes R. Dans le mode préféré de réalisation de la présente invention, les segments d'ADN amplifiés par IRS-PCR sont davantage représentés en bandes R.

Des séquences répétées, analogues aux séquences répétées humaines, sont aussi retrouvées dans le génome des rongeurs. Toutefois la divergence de ce type de séquences entre l'homme et le rongeur est suffisamment importante pour qu'il y ait peu d'homologie entre elles. Cette divergence permet une amplification sélective de segments d'ADN contenus dans le chromosome humain lorsque des hybrides homme-rongeur sont utilisés. Ainsi en partant de l'ADN d'un hybride somatique homme-rongeur et en utilisant des amorces spécifiques de la séquence consensus Alu et/ou L1, on peut amplifier sélectivement par PCR les séquences d'ADN comprises entre deux séquences répétées (en position "tête-bêche") séparées par une distance < 5 kb. Le produit d'amplification ainsi obtenu est constitué d'un ensemble de fragments (dont la taille varie environ de 100 pb à 5 kb) représentatif de la quasi totalité du chromosome humain contenu dans l'ADN de l'hybride somatique.

De façon générale, la présente invention est bien entendu plus particulièrement destinée à réaliser des sondes spécifiques de chromosomes humains, même s'il est possible d'envisager des peintures chromosomiques pour d'autres types cellulaires (Sabile et al., 1997).

Les sondes de la présente invention sont caractérisées en ce que les sondes sont issues d'un mélange de deux produits d'amplification IRS-PCR composé de :

- produit d'amplification PCR obtenu par l'utilisation de l'amorce spécifique des séquences d'ADN Alu,
- produit d'amplification PCR obtenu par l'utilisation de l'amorce spécifique des séquences d'ADN Alu et de l'amorce spécifique des séquences d'ADN LINE.

La présente invention concerne un procédé de production de sondes destinées au marquage de chromosomes humains, caractérisé en ce que ledit procédé comprend le mélange de deux produits d'amplification obtenus par deux amplifications IRS-PCR à partir desdits chromosomes en utilisant d'une part des amorces PCR spécifiques des séquences d'ADN Alu et LINE, et d'autre part des amorces PCR spécifiques des séquences d'ADN Alu.

Toute amorce spécifique des séquences Alu ou LINE peut être utilisée dans la présente invention. De préférence, les amorces spécifiques des séquences d'ADN Alu sont constituées par l'amorce SR1 dont la séquence est décrite dans la SEQ ID No 1 et l'amorce spécifique de la séquence d'ADN LINE est de préférence l'amorce LIH dont la séquence est décrite dans les SEQ ID Nos 2 et 3.

De manière alternative, des sondes selon la présente invention peuvent également être issues d'un mélange de deux produits d'amplification IRS-PCR composé de :

- produit d'amplification PCR obtenu par l'utilisation de l'amorce spécifique des séquences d'ADN LINE,
- produit d'amplification PCR obtenu par l'utilisation de l'amorce spécifique des séquences d'ADN Alu et de l'amorce spécifique des séquences d'ADN LINE.

La présente invention concerne également un procédé de production de sondes destinées au marquage de chromosomes humains, caractérisé en ce que ledit procédé comprend le mélange de deux produits d'amplification obtenus par deux amplifications IRS-PCR à partir desdits chromosomes en utilisant d'une part des amorces PCR spécifiques des séquences d'ADN Alu et
5 LINE, et d'autre part des amorces PCR spécifiques des séquences d'ADN LINE.

La présente invention comprend également l'utilisation de fluorophores et de filtres dont la combinaison permet d'assurer une peinture chromosomique fournissant des caryotypes très lisibles, c'est-à-dire d'obtenir des couleurs de peinture chromosomique contrastées et de bonne définition.

Ainsi, les sondes d'ADN décrites précédemment sont marquées directement ou indirectement
10 par des techniques de fluorescence. De manière non exhaustive, les fluorophores utilisés pour le marquage peuvent être choisis parmi les marqueurs de type cyanine, rhodamine, fluorescéine, Bobipy, Rouge Texas, Vert Oregon, Bleu Cascade. Notamment, tous les fluorophores cités dans le « Handbook of fluorescent probes and research chemicals » (Richard P Haugland, 1996, Molecular Probes, MTZ Spence Ed., plus particulièrement p 145-146, 153, 155-156, 157-158, 161) peuvent
15 être utilisés pour marquer les sondes de la présente invention.

De préférence, les sondes selon l'invention sont marquées par au moins 1, 2, 3, 4, ou 5 fluorophores choisis parmi le groupe suivant : isothiocyanate de fluoresceine (FITC), Rouge Texas (TR pour Texas Red), cyanine 3 (Cy3), cyanine 5 (Cy5), cyanine 5,5 (Cy5,5), cyanine 7 (Cy7), Bodipy 630/650.

20 La méthode préférée de marquage des sondes d'ADN est la « Nick translation ». Néanmoins, le marquage peut être également effectuer selon toutes les réactions standards de synthèse d'ADN catalysée par une polymérase et de marquage d'oligonucléotides. Par exemple, le marquage peut être réalisé par les techniques d'amorçage aléatoire, d'amplification, d'extension d'amorce in situ.

Le terme "sonde directement marquée" désigne ou décrit une sonde d'acide nucléique dont le
25 marquage après la formation d'hybride avec la cible est détectable sans traitement réactif subséquent de l'hybride. Les sondes utilisant les fluorophores FITC, Rouge Texas, Cy3 et Cy5 selon la présente invention sont directement marquées.

Le terme "sonde indirectement marquée" désigne ou décrit une sonde d'acide nucléique dont le marquage après la formation d'hybride avec la cible doit subir un traitement réactif supplémentaire
30 avec un ou plusieurs réactifs pour y associer une ou plusieurs entités dont résulte(nt) finalement un composé détectable. Par exemple, les sondes peuvent être marquées par le DNP, la digoxigénine ou la biotine et la révélation comprend la mise en contact de la sonde avec un anticorps anti-DNP ou anti-digoxigénine marqué par un fluorophore ou avec une avidine couplée à un fluorophore. Les sondes utilisant les fluorophores Cy7, Bodipy 630/650, Cy 5.5 selon la présente invention sont
35 indirectement marquées.

De préférence, la composition en sondes de la présente invention comprend le plus grand nombre possible de sondes « directement marquées ». Outre que les sondes directement marquées

sont d'un usage plus facile, elles permettent une meilleure résolution. Cette bonne résolution est importante pour une bonne observation des bandes chromosomiques. De préférence, la composition en sondes de la présente invention est de type « marquage direct » pour tous les fluorophores. Une composition en sonde préférée de la présente invention est de type "marquage direct" pour 4 des 5 fluorophores utilisés. Dans une autre composition préférée, les sondes directement marquées représentent 3 sondes sur 5 ou 6 fluorophores utilisés.

La présente invention concerne également un ensemble de sondes destinées au marquage de chromosomes humains, caractérisées en ce qu'il contient des sondes selon la présente invention pour chacun des chromosomes humains ou pour un certain nombre d'entre eux. Cet ensemble de sondes permettra d'analyser en une seule fois un caryotype complet afin d'y détecter et d'y identifier d'éventuelles aberrations chromosomiques telles que décrites précédemment.

La présente invention concerne également un procédé FISH multicolore destiné à l'étude du caryotype, caractérisé en ce que les sondes d'ADN sont marquées par des fluorophores et en ce que chaque fluorophore de longueur d'onde d'absorption et d'émission spécifique est associé à un couple de filtres optiques, un pour l'absorption et un pour l'émission.

Les fluorophores sont choisis de telle sorte que le chevauchement des spectres d'absorption et d'émission entre les différents fluorophores soit minimal. Plus particulièrement, il est important qu'il n'y ait pas de chevauchement entre les maxima d'absorption et d'émission des différents fluorophores.

Chaque fluorophore est utilisé avec un couple de filtres optiques ; un pour l'absorption et un pour l'émission. Les filtres permettent de sélectionner des bandes passantes de telles sortes que les longueurs d'onde correspondant à un chevauchement avec un autre fluorophore soit éliminées. C'est pourquoi les filtres utilisés dans la présente invention sont de préférence du type filtre optique à bande passante étroite. Les filtres sont de préférence de qualité supérieure car il est important que le filtre ne laisse pas passer de lumière en dehors de la bande passante.

De préférence, la présente invention concerne également un procédé FISH multicolore destiné notamment à l'étude du caryotype, caractérisé en ce que les sondes d'ADN selon la présente invention sont marquées par des fluorophores et en ce que chaque fluorophore de longueur d'onde d'absorption et d'émission spécifique est associé à un couple de filtres optiques, un pour l'absorption et un pour l'émission, ledit procédé utilisant des fluorophores et des couples de filtres choisis parmi le groupe suivant :

a) le fluorophore FITC ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 494 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 517 nm associé à un filtre à l'excitation de type 490DF30 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 530DF30 (Omega Optical),

b) le fluorophore Cy3 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 554 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 568 nm associé à un filtre à l'excitation de type 546DF10 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 570DF10 (Omega Optical),

c) le fluorophore TR ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 593 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 613 nm associé à un filtre à l'excitation de type 590DF10 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 615DF10 (Omega Optical),

5 d) le fluorophore Cy5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 652 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 670 nm associé à un filtre à l'excitation de type 650DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 670DF10 (Omega Optical),

e) le fluorophore Cy7 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 743 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 767 nm associé à un filtre à l'excitation de type 740DF25 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 780EFLP (Omega Optical),

10 f) le fluorophore Cy5,5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 675 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 694 nm associé à un filtre à l'excitation de type 680DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 700EFLP (Omega Optical),

g) le fluorophore Bodipy 630/650 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 632 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 658 nm associé à un filtre à l'excitation
15 de type 630DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 650DF10 (Omega Optical).

L'invention concerne également un kit de diagnostic FISH multicolore caractérisé en ce qu'il comprend des sondes d'ADN selon la présente invention marquées par des fluorophores et en ce que chaque fluorophore de longueur d'onde d'absorption et d'émission spécifique est associé à un couple de filtres optiques, un pour l'absorption et un pour l'émission, ledit kit utilisant des fluorophores et
20 des couples de filtres choisis parmi le groupe suivant :

a) le fluorophore FITC ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 494 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 517 nm associé à un filtre à l'excitation de type 490DF30 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 530DF30 (Omega Optical),

25 b) le fluorophore Cy3 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 554 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 568 nm associé à un filtre à l'excitation de type 546DF10 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 570DF10 (Omega Optical),

c) le fluorophore TR ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 593 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 613 nm associé à un filtre à l'excitation de type 590DF10 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 615DF10 (Omega Optical),

30 d) le fluorophore Cy5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 652 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 670 nm associé à un filtre à l'excitation de type 650DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 670DF10 (Omega Optical),

e) le fluorophore Cy7 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 743 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 767 nm associé à un filtre à l'excitation de type
35 740DF25 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 780EFLP (Omega Optical),

f) le fluorophore Cy5,5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 675 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 694 nm associé à un filtre à l'excitation de type 680DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 700EFLP (Omega Optical),

g) le fluorophore Bodipy 630/650 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 632 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 658 nm associé à un filtre à l'excitation de type 630DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 650DF10 (Omega Optical).

Les filtres selon la présente invention sont de préférence tels :

- qu'ils soient de type 6 cavités,
- qu'ils aient une ADI de 0°;
- qu'ils aient une tolérance $\lambda_0 \pm 20\%$ de FWHM,
- qu'ils aient une tolérance sur FWHM de $\pm 20\%$ de FWHM,
- qu'ils aient une réjection hors bande passante OD5 de UV à 1200 nm
- qu'ils aient une courbe de transmission $T \geq 50\%$ à λ_0 .

De préférence, les filtres doivent également avoir un diamètre utile centré supérieur à 21 mm, et une épaisseur ≤ 7 mm,

Les fluorophores et les filtres précédents peuvent être utilisés pour le marquage des sondes selon la présente invention ou bien pour des sondes différentes utilisées, par exemple pour la peinture chromosomique ou pour le FISH multicolore.

Dans la présente invention, on entend par "filtres" des filtres interférentiels à bande passante étroite qui transmettent la lumière à l'intérieur d'une bande spectrale donnée très étroite, centrée autour de la longueur d'onde λ_0 de référence. Ils sont caractérisés par leur courbe de transmission : $T = f(\lambda)$. La largeur de la bande est définie par la largeur totale à la moitié du maximum de transmission (FWHM pour "Full Width at Half Maximum transmission").

En dehors de la bande passante, le filtre laisse passer un signal résiduel qui a tout intérêt à être le plus atténué possible.

Les filtres interférentiels fonctionnent sur le principe des interférences constructives et destructives. La composante de base d'un filtre interférentiel est appelée cavité. Elle comporte deux piles de réflecteurs séparées par une couche d'un solide diélectrique. Plus le nombre de cavités est important, plus la forme de la courbe de transmission est rectangulaire (c'est-à-dire, plus la pente de cette courbe est importante). D'autre part, plus le nombre de cavités est important, meilleur est le coefficient d'atténuation en dehors de la bande passante.

Pour l'application de multifuorescence, les spectres d'excitation ou d'émission des fluorochromes utilisés sont très proches les uns des autres. Il faut donc récupérer le minimum de signal possible en dehors de la bande passante. C'est pourquoi, on a choisi des filtres à 6 cavités qui offrent les meilleures caractéristiques à ce niveau.

Les filtres utilisés ont de préférence les spécifications suivantes :

- ils sont conçus pour être utilisés en incidence normale de la lumière,

- la tolérance sur la longueur d'onde centrale (λ_0) est de $\pm 20\%$ de la bande passante, par exemple, pour un filtre de bande passante de 10 nm, λ_0 sera définie avec une tolérance de ± 2 nm,

- la tolérance sur la largeur de la bande passante est de $\pm 20\%$,
- 5 - le coefficient de transmission T de ces filtres est supérieur à 50%,
- la réjection hors bande passante de ces filtres est de 5OD de l'ultra-violet à 1200 nm, ceci signifie qu'en dehors de la bande passante, le coefficient de transmission est de 10^{-5} , soit 0,001%. Pour des filtres standards, la réjection hors bande passante est assurée pour des longueurs d'onde allant de $0,8 \lambda_0$ à $1,2 \lambda_0$, par exemple, pour un filtre de $\lambda_0 = 620$ nm, la
- 10 réjection hors bande passante se fait seulement entre 500 et 740nm. Or, pour l'application de multifuorescence, on observe des fluorochromes dont les spectres s'étendent de 350 à 800 nm. C'est pourquoi on a utilisé des filtres dont la réjection hors bande passante est assurée de l'ultra-violet à 1200 nm.

La présente invention concerne enfin un kit de marquage caractérisé en ce qu'il comprend au
15 moins des sondes d'ADN telles que décrites précédemment ou un ensemble de sondes tel que mentionné précédemment.

La présente invention concerne un kit de diagnostic FISH multicolore, caractérisé en ce qu'il comprend les sondes d'ADN telles que décrites précédemment ou un ensemble de sondes d'ADN tel que mentionné précédemment et une combinaison de filtres et de fluorophores tels que décrits
20 précédemment.

La technique FISH ou multi-FISH à laquelle il est ou il sera fait allusion à plusieurs reprises dans la présente description est notamment décrite dans Speicher et al., 1996 ; Schröck et al., 1996.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples ci-après.

25 Les combinaisons de fluorophores et de filtres optiques décrites dans l'invention peuvent être utilisées dans de multiples techniques impliquant la microscopie de fluorescence. En effet, les fluorophores décrits dans la présente invention peuvent être utilisés pour marquer de nombreuses molécules ou structures. De manière non exhaustive, lesdits fluorophores peuvent être utilisés pour marquer des polypeptides, des anticorps, des acides nucléiques, des phospholipides, des acides gras,
30 des dérivés stéroïdes, des membranes, des organelles et beaucoup d'autres macromolécules biologiques. Les organelles peuvent être les mitochondries, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, et les lysosomes.

La combinaison de fluorophores et de filtres optiques selon l'invention peuvent être utilisée pour effectuer du FISH. Notamment, cela peut permettre l'utilisation simultanée de plusieurs sondes.
35 Cette combinaison peut être utilisée pour étudier de multiples aspects comme la morphologie cellulaire, le cytosquelette, les récepteurs cellulaires, les canaux ioniques, les neurotransmetteurs, la circulation des fluides, la fluidité membranaire, la viabilité et la prolifération cellulaire, l'apoptose,

la pinocytose, l'endocytose et l'exocytose, la transduction, le pH et les concentrations ioniques (par exemple de calcium, potassium, magnésium et zinc) (Richard P Haugland, 1996, Molecular Probes, MTZ Spence Ed.). Elle peut permettre d'étudier l'expression et la traduction.

L'invention concerne donc également une combinaison de fluorophores choisis parmi :
5 isothiocyanate de fluoresceine (FITC), Rouge Texas (TR pour Texas Red), cyanine 3 (Cy3), cyanine 5 (Cy5), cyanine 5,5 (Cy5,5), cyanine 7 (Cy7), Bodipy 630/650.

De préférence, la combinaison de fluorophores comprend au moins 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 fluorophores choisis parmi : isothiocyanate de fluoresceine (FITC), Rouge Texas (TR pour Texas Red), cyanine 3 (Cy3), cyanine 5 (Cy5), cyanine 5,5 (Cy5,5), cyanine 7 (Cy7), Bodipy 630/650.

10 Une combinaison de fluorophores préférée de la présente invention comprend les 5 fluorophores suivants : l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC); le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), et la cyanine 7 (Cy7).

Une autre combinaison de fluorophores préférée de la présente invention comprend les 6 fluorophores suivants : l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3
15 (Cy3), le Bodipy 630/650, la cyanine 5 (Cy5), et la cyanine 7 (Cy7).

Une autre combinaison de fluorophores préférée de la présente invention comprend 6 fluorophores suivants : l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), le Bodipy 630/650, et la cyanine 5 (Cy5).

Les combinaisons de fluorophores selon l'invention peuvent être comprises dans un kit de
20 diagnostic FISH multicolore.

Les combinaisons de fluorophores selon l'invention peuvent être utilisées pour marquer une entité choisie parmi les polypeptides, les anticorps, les acides nucléiques, les phospholipides, les acides gras, les dérivés stéroles, les membranes, les organelles et les macromolécules biologiques

En outre, l'invention concerne une combinaison de fluorophores associés à un couple de
25 filtres optiques choisis parmi :

a. le fluorophore FITC ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 494 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 517 nm associé à un filtre à l'excitation de type 490DF30 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 530DF30 (Omega Optical),

b. le fluorophore Cy3 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 554 nm et une
30 longueur d'onde maximale d'émission de 568 nm associé à un filtre à l'excitation de type 546DF10 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 570DF10 (Omega Optical),

c. le fluorophore TR ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 593 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 613 nm associé à un filtre à l'excitation de type 590DF10 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 615DF10 (Omega Optical),

35 d. le fluorophore Cy5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 652 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 670 nm associé à un filtre à l'excitation de type 650DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 670DF10 (Omega Optical),

e. le fluorophore Cy7 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 743 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 767 nm associé à un filtre à l'excitation de type 740DF25 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 780EFLP (Omega Optical),

5 f. le fluorophore Cy5,5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 675 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 694 nm associé à un filtre à l'excitation de type 680DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 700EFLP (Omega Optical),

g. le fluorophore Bodipy 630/650 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 632 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 658 nm associé à un filtre à l'excitation de type 630DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 650DF10 (Omega Optical).

10 De préférence, la combinaison de fluorophores associés à un couple de filtres optiques comprend au moins 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7 fluorophores et filtres choisis parmi :

a) le fluorophore FITC ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 494 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 517 nm associé à un filtre à l'excitation de type 490DF30 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 530DF30 (Omega Optical),

15 b) le fluorophore Cy3 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 554 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 568 nm associé à un filtre à l'excitation de type 546DF10 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 570DF10 (Omega Optical),

c) le fluorophore TR ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 593 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 613 nm associé à un filtre à l'excitation de type 590DF10 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 615DF10 (Omega Optical),

20 d) le fluorophore Cy5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 652 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 670 nm associé à un filtre à l'excitation de type 650DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 670DF10 (Omega Optical),

e) le fluorophore Cy7 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 743 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 767 nm associé à un filtre à l'excitation de type 740DF25 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 780EFLP (Omega Optical),

f) le fluorophore Cy5,5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 675 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 694 nm associé à un filtre à l'excitation de type 680DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 700EFLP (Omega Optical),

30 g) le fluorophore Bodipy 630/650 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 632 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 658 nm associé à un filtre à l'excitation de type 630DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 650DF10 (Omega Optical).

Les combinaisons de fluorophores associés au couple de filtres optiques selon l'invention peuvent être comprises dans un kit de diagnostic FISH multicouleur.

35 Les combinaisons de fluorophores associés à un couple de filtres optiques selon l'invention peuvent être utilisées pour marquer une entité choisie parmi les polypeptides, les anticorps, les

acides nucléiques, les phospholipides, les acides gras, les dérivés stéroles, les membranes, les organelles et les macromolécules biologiques

Les sondes et les combinaisons de fluorophores selon l'invention peuvent être utilisées avec tout type de microscopes (microscope à fluorescence, laser, monochromateur). De préférence,

5 l'invention utilise un microscope à fluorescence.

Diverses publications et brevets sont cités dans la description. Les divulgations contenus dans les publications et brevets référencés dans cette demande sont incorporées par référence dans la présente demande pour une plus ample description du contenu de la présente invention.

10

EXEMPLES

1. Préparation des sondes

L'ADN génomique extrait de différentes lignées hybrides somatiques homme-rongeur (NIGMS Human genetic Mutant Cell Repository, Coriell Institute for Medical Research, Camdem)

15 (tableau 1) a servi de matrice pour la PCR.

Tableau 1

Chromosome	Référence lignée
1	GM 13139
2	GM 10826B
3	GM 10253
4	GM 10115
5	GM 10114
6	GM 11580
7	GM 10791
8	GM 10156C
9	GM 10611
10	GM 10926B
11	GM10927A
12	GM 10868
13	GM 10898
14	GM 11535
15	GM 11715
16	GM 10567
17	GM 10498
18	GM 11010

19	GM 10449
20	GM 13260
21	GM 10323
22	GM 10888
X	GM 6318B

La PCR a été réalisée soit en présence uniquement de l'amorce SR1 (située à l'extrémité 3' de la séquence consensus Alu, position 241 à 261 : 5' CCACTGCACTCCAGCCTGGG 3' (SEQ ID N° 1) (Romana et al., 1993), soit en présence de l'amorce SR1 et de l'amorce L1H:

5 5' CATGGCACATGTATACATATGTAAC(A/T)AACC 3' (SEQ ID N° 2 et N 3) (Ledbetter et al., 1990). Lorsqu'on a utilisé au cours de la PCR uniquement l'amorce SR1, le produit d'amplification marqué et utilisé comme sonde sur chromosomes métaphasiques a été coloré presque totalement le chromosome correspondant (à l'exception des régions centromériques) avec un profil de bandes de type R (comme cela a été décrit par Lichter et al., 1990 avec d'autres types
10 d'amorces Alu). Cependant, afin d'avoir une représentation des bandes R négatives, on a effectué également une PCR en incorporant les 2 amorces : SR1 et L1. Ainsi, lorsque les 2 produits d'amplification (SR1 et SR1/L1) ont été mélangés et utilisés comme sonde, les bandes R négatives ont bien été colorées et les régions télomériques ont été parfaitement délimitées.

Conditions de PCR

15 La réaction de PCR a eu lieu dans un volume final de 50 µl contenant 500 ng d'ADN génomique (hybride somatique), 1 µM de chaque oligonucléotide (soit 1 µM SR1, soit 1 µM SR1 et 1 µM L1H), 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,01% gélatine, 250 µM de chaque déoxynucléotide triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) et 2,5 U d'ADN-polymérase *Thermophilus aquaticus* (Perkin-Elmer-Cetus). La dénaturation initiale a été effectuée à 96°C
20 pendant 6 min., suivie de 30 cycles : dénaturation à 94°C pendant 1 min., association à 63°C pendant 1 min., élongation à 72°C pendant 10 min. A la fin des cycles, une élongation finale à 72°C pendant 10 min. a été réalisée.

Les 2 produits d'amplification (SR1 et SR1/L1H) ont été mélangés puis précipités à l'éthanol. Le culot d'ADN a été repris dans 20 µl d'eau et la concentration d'ADN a été estimée sur un gel
25 d'agarose 1,3%.

Marquage des sondes par "Nick translation"

15 µg du mélange de produits PCR ont pu être marqués au cours d'une seule réaction de Nick translation. La réaction a eu lieu dans un volume final de 500 µl, contenant 20 µM de chacun des déoxynucléotides triphosphates (dATP, dGTP, dCTP), 10 µM de dTTP et 10 µM de dUTP modifié,
30 Tris-HCl 50 µM, MgCl₂ 5 µM, β-mercaptoéthanol 1 µM et 20 U de mélange d'enzymes (Dnase/Polymérase : Boehringer-Mannheim). Pour marquer directement la sonde en fluorescence le nucléotide modifié a été soit du dUTP-12-FITC (Boehringer-Mannheim) ou dUTP-12-Texas red

(Molecular Probes) ou dUTP-Cy3 (Amersham) ou dUTP-Cy5 (Amersham). Par contre, pour un marquage indirect on a utilisé du dUTP-16-biotinylé (Boehringer-Mannheim). Le marquage a été réalisé en tube Eppendorf (2 ml) sur la nuit à 15-16°C. Les nucléotides libres ont ensuite été éliminés par précipitation de la sonde à l'éthanol. Le culot d'ADN a été repris dans 500 µl de TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH8) afin que la sonde soit à une concentration d'environ 30 ng/µl.

Composition du mélange des 23 sondes de peinture chromosomique

Chaque sonde spécifique d'un chromosome a été marquée individuellement avec les différents dUTP-modifiés (fluorescents ou non). En fonction de la richesse en bandes R et G de chacun des chromosomes et en fonction de leur taille, on a a priori établi ceux qui devaient ou non être composés de différents fluorochromes. Par exemple, des combinaisons de 3 ou 4 fluorochromes ont été de préférence utilisées pour des chromosomes riches en bandes R (ex : chromosome 19), par contre pour des chromosomes pauvres en bandes R, seulement 1 à 2 fluorochromes ont été utilisés (ex : chromosome 8). Ce choix dépendait également, pour chaque fluorochrome, de la combinaison des filtres d'excitation et d'émission. En effet, lorsqu'une sonde a été marquée en proportion équivalente avec différents fluorochromes, les intensités de signal des différents fluorochromes ne sont pas forcément comparables. Cela dépend en effet de la qualité des filtres d'excitation et d'émission pour chaque fluorochrome, mais aussi de la quantité de fluorescence émise par le fluorochrome. Celle-ci dépend elle-même de l'intensité du flux lumineux à l'excitation et donc du pouvoir spectral de la source de lumière (Lampe Mercure HBO 100 W - OSRAM). Parmi tous ces paramètres, on a plutôt choisi d'optimiser le pouvoir de résolution des combinaisons de filtres, afin d'obtenir à l'émission le meilleur rapport signal/bruit de fond pour chaque fluorochrome. En effet, les différences d'intensité de fluorescence peuvent être compensées d'une part en augmentant ou diminuant les temps d'exposition au cours de l'acquisition de l'image par la caméra (Hamamatsu C4880), mais également en faisant varier les concentrations des sondes selon le marqueur fluorescent utilisé. Finalement, les concentrations des sondes ont été ajustées de sorte que pour un fluorochrome donné (et donc pour une combinaison de filtres données), tous les chromosomes marqués émettent une fluorescence d'intensité équivalente.

La composition des 23 sondes de peinture chromosomique a donc été définie expérimentalement et de façon précise après de nombreuses expériences de contrôle (tableau 2).

400 µg (environ 27 fois) d'ADN Cot1 (ADN compétiteur humain) ont été rajoutés à ces 1470 ng de mélange de sondes chromosomiques (50 sondes différentes). Le mélange d'ADN a ensuite été précipité à l'éthanol. Le culot a été repris dans 10 µl de mélange d'hybridation (50% formamide, 10% sulfate dextran, 2 X SSC (pH 7), 1 µg/µl d'ADN de sperme de hareng soniqué).

Tableau 2

Fluor Chrom.	FITC	Cy3	TR	Cy5	Bio/Cy7	Mélange 1470ng=
1		35				35
2			40			40
3	30				25	55
4				50		50
5	50					50
6				40	30	70
7			30		35	65
8	60			30		90
9	30	20				50
10		30	25		20	75
11		30		40		70
12			35	50		85
13	60		45			105
14	25	20			25	70
15	50	15	15			80
16	30	20		20		70
17		15		25	20	60
18					40	40
19	25	10	20		20	75
20		20	20	30		70
21		30	30			60
22	10		15	20		45
X		30			30	60

Nom complet des fluorochromes :

FITC : Fluorescein isothiocyanate ; TR : Texas Red ; Cy3 : Cyanine 3 ; Cy5 : Cyanine 5 ; Bio : Biotine ; Cy7 : Cyanine 7

Une alternative de préparation des sondes

De manière alternative, la préparation du mélange des sondes a été réalisée avant leur marquage par Nick translation pour chaque fluorochrome (Tableau 3). On a obtenu ainsi 5 mélanges de sondes qui ont été marqués par Nick translation à l'aide de nucléotides modifiés selon le

5 protocole suivant.

1 à 2 µg du mélange de sondes ont été marqués par nick translation dans un volume de 50 µl contenant : 20 µM de chacun des déoxynucléotides triphosphates (dATP, dGTP, dCTP), 10 µM de dTTP et 10 µM de dUTP modifié, Tris-HCl 50 µM, MgCl₂ 5 µM, β-mercaptoéthanol 1 µM et 20 U de mélange d'enzymes (Dnase/Polymérase : Boehringer-Mannheim). Pour marquer directement la

10 sonde en fluorescence le nucléotide modifié a été du dUTP-12-FITC (Boehringer-Mannheim) ou dUTP-12-Texas red (Molecular Probes) ou dUTP-Cy3 (Amersham) ou dUTP-Cy5 (Amersham). Par contre, pour un marquage indirect on a utilisé du dUTP-16-biotinylé (Boehringer-Mannheim). Le marquage a été réalisé en tube Eppendorf (2 ml) sur la nuit à 15-16°C.

Après marquage, les 5 mélanges de sondes chromosomiques (14,75 µg) ont été précipités

15 ensemble (à l'éthanol) en présence de 400 µg (environ 27 fois) d'ADN Cot1 (ADN compétiteur humain). Le culot a été repris dans 10 µl de mélange d'hybridation (50% formamide, 10 % sulfate dextran, 2 X SSC (pH7), 1 µg/µl d'ADN de sperme de hareng soniqué).

Cette méthode alternative de marquage présente l'avantage d'alléger et de simplifier le protocole de marquage des sondes en réduisant le nombre de marquages par Nick translation à cinq

20 au lieu de cinquante et en ne réalisant qu'un seul mélange de sondes au lieu de deux.

2. Hybridation *in situ* fluorescente

La procédure a été celle décrite par Cherif et al., 1990, avec quelques modifications.

Préparation des chromosomes en métaphase

La préparation des chromosomes métaphasiques a été réalisée à partir d'une culture de

25 lymphocytes circulants obtenus par ponction veineuse d'un sujet normal. Les lymphocytes stimulés par la phytohémagglutinine (PHA) (100 µl pour 8 ml de culture) ont été mis en culture pendant 72 heures à 37°C dans du milieu RPMI-1640. Les cellules ont ensuite été synchronisées en ajoutant du méthotrexate (10 µM) pendant 17 heures puis rincées et remises en culture en présence de 5-bromodéoxyuridine (BrdU) (0,1 mM) pendant 6 heures. Après action de la colchicine (1 mg/ml)

30 pendant 15 min, l'éclatement des cellules a été obtenu par resuspension dans une solution hypotonique de KCl (75 mM). Les chromosomes ont été fixées dans un mélange méthanol/acide acétique (3 vol/1 vol) et une à deux gouttes de suspension cellulaire ont été étalées sur chaque lame. Les lames séchées à température ambiante pendant 2 à 3 jours ont ensuite été stockées à -20°C pendant plusieurs mois.

Tableau 3

Fluor. Chrom.	FITC	Cy3	TR	Cy5	Bio/Cy7	Mélange
1		0,3				0,3
2			0,4			0,4
3	0,3				0,25	0,55
4				0,5		0,5
5	0,5					0,5
6				0,4	0,3	0,7
7			0,3		0,35	0,65
8	0,6			0,3		0,9
9	0,3	0,2				0,5
10		0,3	0,25		0,2	0,75
11		0,3		0,4		0,7
12			0,35	0,5		0,85
13	0,6		0,45			0,105
14	0,25	0,2			0,25	0,7
15	0,5	0,15	0,15			0,8
16	0,3	0,2		0,2		0,7
17		0,15		0,25	0,2	0,6
18					0,4	0,4
19	0,25	0,1	0,2		0,2	0,75
20		0,2	0,2	0,3		0,7
21		0,3	0,3			0,6
22	0,1		0,15	0,2		0,45
X		0,3			0,3	0,6
Total (µg)	3,7	2,7	2,75	3,15	2,45	14,75

Nom complet des fluorochromes :

FITC : Fluorescein isothiocyanate ; TR : Texas Red ; Cy3 : Cyanine 3 ; Cy5 : Cyanine 5 ; Bio : Biotine ; Cy7 : Cyanine 7

Préparation des lames

Les lames ont été traitées à l'ARNase (100 µg/ml) pendant 1 heure à 37°C puis rincées 3 fois (5 min. chaque) dans une solution de 2 X SSC, pH 7. Les lames ont ensuite été déshydratées par passages successifs dans une série de bains d'éthanol à concentration croissante (70%, 80%, 90% et 100% et 2 min. par bain), et séchées. La dénaturation de l'ADN chromosomique a été faite par immersion des lames dans un bain de formamide 70% / 2 X SSC (pH 7) à 70°C pendant 2 minutes. La dénaturation a été arrêtée en plongeant les lames (2 minutes) dans de l'éthanol 70% refroidi à -20°C et maintenu dans un bac à glace. Puis les lames ont été déshydratées par passages successifs dans une série de bains d'éthanol à concentration croissante et séchées. Les lames ont ensuite été incubées pendant 8 à 10 min. à 37°C dans une solution (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2 mM CaCl₂) contenant de la protéinase K (100 ng/ml) puis déshydratées dans une série de bains d'éthanol et séchées.

Hybridation et détection du signal

Le mélange de sondes et d'ADN compétiteur (10 µl) a été dénaturé 10 min. à 70°C puis plongé dans de la glace et préhybridé pendant au moins 3 heures à 37°C. Ce mélange a ensuite été déposé sur la lame et recouvert d'une lamelle (18 X 22 mm). L'hybridation a eu lieu pendant 2-3 jours à 37°C en chambre humide.

Les lames ont ensuite été lavées dans une série de 3 bains de formamide 50%, 2 X SSC, pH 7 (3 min. chaque) à une température de 42-45°C, suivis de 5 lavages dans 2 X SSC, pH 7 (2 minutes chaque) et d'un lavage d'une minute dans une solution 1 X BN (0,1 M bicarbonate de sodium, 0,05% nonidet P-40). Les sondes biotinylées ont été détectées par adjonction d'avidine (Vector Laboratories Biosys) couplée à la cyanine7 (Amersham) (Avidine-Cy7) (5 µg/ml). Le couplage de l'avidine à la cyanine 7 a été réalisé avec un kit de couplage (Amersham). Afin de diminuer les problèmes de bruit de fond liés à des liaisons non spécifiques de l'avidine, les lames ont été préalablement incubées pendant 10 minutes dans une solution 1 X BN contenant 5% de lait en poudre écrémé. Les lames ont ensuite été incubées 1/2 heure à 37°C dans une solution contenant de l'avidine-Cy7 (5 µg/ml dans 1 X BN + 5% de lait en poudre) puis lavées successivement 3 fois (2 minutes) dans une solution 1 X BN à 45°C. Le signal fluorescent a été amplifié par adjonction d'une couche d'anticorps anti-avidine biotinylés (5 µg/ml) (Vector Laboratories, Biosys France), suivie d'une couche d'avidine-Cy7 (5 µg/ml) selon le protocole décrit par Pinkel et al., 1986. Pour chaque couche, les lames ont été incubées pendant 30 minutes à 37°C puis lavées 3 fois dans une solution 1 X BN. Les sondes marquées avec dUTP-FITC, dUTP-TR, dUTP-Cy3 et dUTP-Cy5 n'ont nécessité aucune étape de révélation supplémentaire.

L'observation des lames a été réalisée à l'aide d'un photomicroscope à épifluorescence (DMRX B, LEICA) équipé de la combinaison de filtres décrite précédemment. Deux roues indépendantes ont été utilisées pour porter 8 filtres chacune. La roue portant les filtres d'excitation a été insérée immédiatement après la lampe Hg et celle portant les filtres d'émission a été placée au

dessus des objectifs et du filtre séparateur de faisceau. Avant l'acquisition des images, 20 µl d'une solution anti-fade (Johnson et al., 1981) ont été déposés sur chaque lame et recouverts d'une lamelle (solution anti-fade : 100 mg de PPD (p-phénylènediamine, Sigma) dans une solution composée de 10 ml de PBS et 90 ml de glycérol ; le pH de la solution a été ajusté à 8,0 avec du NaOH 0,1 M). La solution anti-fade permet d'éviter l'extinction rapide de la fluorescence émise par les différents fluorochromes lorsqu'ils sont soumis à une forte irradiation.

3. Exemple d'utilisation d'une combinaison de 6 fluorophores

La cyanine 7 étant un fluorochrome relativement instable, on a essayé de le remplacer par un autre fluorochrome, par exemple le Bodipy 630/650 (Molecular Probes). Couplé à un anticorps ou une molécule d'avidine, le Bodipy permet de révéler indirectement une sonde marquée à la biotine, à la digoxigénine ou au dinitrophénol (DNP). Dans ce cas, le choix des 5 fluorochromes pour la multifuorescence ne peut plus être le même car les spectres d'absorption et d'émission de la cyanine 5 et du Bodipy 630/650 sont trop proches pour qu'il y ait une bonne discrimination entre ces deux fluorochromes. Le choix sera le suivant :

- isothiocyanate fluoresceine (FITC)
- rouge Texas (TR)
- Cyanine 3 (Cy3)
- Bodipy 630/650
- Cyanine 5,5 (Cy5,5)

Ce choix a également l'avantage de permettre d'utiliser la cyanine 7 comme 6ème fluorochrome en cas de nécessité (par exemple pour des applications où l'on ne peut pas faire du marquage combinatoire de sonde, et où il serait avantageux d'avoir différentes sondes pouvant être discriminées avec un maximum de fluorochromes différents).

Dans ce cas, la Cy5,5 devra également être couplée à un anticorps ou une molécule d'avidine pour pouvoir révéler une sonde marquée à la biotine, à la digoxigénine ou au DNP.

Par exemple, pour le caryotypage en multifuorescence, les différents systèmes de marquage et de révélation des sondes seront :

<u>Marquage</u>	<u>Type de marquage</u>	<u>Révélation</u>
isothiocyanate fluoresceine (FITC)	direct	non
rouge Texas (TR)	direct	non
Cyanine 3 (Cy3)	direct	non
digoxigénine (Dig)	indirect	anti dig-Bodipy 630/650
biotine (Bio)	indirect	avidine-Cy5,5

Au cas où l'on souhaiterait utiliser 6 fluorochromes à la fois, le choix pourrait être :

	<u>Marquage</u>	<u>Type de marquage</u>	<u>Révélation</u>
	isothiocyanate fluoresceine (FITC)	direct	non
	rouge Texas (TR)	direct	non
5	Cyanine 3 (Cy3)	direct	non
	dinitrophénol (DNP)	indirect	anti DNP-Bodipy 630/650
	digoxigénine (Dig)	indirect	anti dig-Cy5,5
	biotine (Bio)	indirect	avidine-Cy7

- 10 Bien que les modes de réalisation préférés de l'invention ont été illustrés et décrits, il doit être estimé que de multiples changements peuvent être exécuté par l'homme du métier s'écarter de l'esprit et de la portée de la présente invention.

TEXTE LIBRE DU LISTAGE DE SEQUENCE

- 15 primer PCR LINE
primer PCR Alu

REFERENCES

- Cherif D., Julier C., Delattre O., Derre J., Lathrop GM., Berger R., (1990). Simultaneous localization of cosmids and chromosome R-banding by fluorescence microscopy: Application to regional mapping of chromosome 11. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6639.
- Dutrillaux B., Lejeune J. (1971). Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. C.R. Acad. Sci. 272, 2638.
- Johnson G.D., De Nogueira C., Arango J.G.M. (1981). A simple method for reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. J. Immunol. Methods 43, 349.
- Korenberg J.R., Rikowski M.C. (1988). Human genome organization: Alu, Lines and the molecular structure of metaphase chromosome bands. Cell 53, 391.
- Ledbetter S.A., Garcia-Heras J., Ledbetter D.H. (1990). "PCR-karyotype" of human chromosomes in somatic cell hybrids. Genomics 8, 614.
- Lichter P., Ledbetter S.A., Ledbetter D.H., Ward D.C. (1990). Fluorescence *in situ* hybridization with Alu and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6634.
- Pinkel D., Straume T., Gray J.W. (1996). Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2934.
- Richard P Haugland, 1996, Molecular Probes, MTZ Spence Ed. « Handbook of fluorescent probes and research chemicals »
- Romana S.P., Tachdjian G., Druart L., Cohen D., Berger R., Cherif D. (1993). A simple method for prenatal diagnosis of trisomy 21 on uncultured amniocytes. Eur. J. Hum. Genet. 1, 245.
- Sabile A., Poras I., Cherif D., Goodfellow P., Avner P. (1997). Isolation of monochromosomal hybrid for mouse chromosomes 3,6, 10, 12, 14 and 18. Mammalian Genome 8, 81.
- Schröck E., du Manoir S., Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M.A., Ning Y., Ledbetter D.H., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y., Ried T. (1996). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science 273, 494-497.
- Speicher M.R., Ballard S.G., Ward DC. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nature Genetics 12, 368-375.
- Summer A.T., Evans H.J., Buckland R.A. (1971). A new technique for distinguishing between human chromosomes. Nature (New Biol) 232, 31.

REVENDICATIONS

1) Sondes destinées au marquage d'un chromosome, caractérisées en ce qu'elles sont composées d'un ensemble de segments d'ADN davantage représentés dans certaines bandes chromosomiques et obtenus par amplification IRS-PCR à partir desdits chromosomes à l'aide d'amorces spécifiques des séquences d'ADN Alu et LINE.

2) Sondes selon la revendication 1, caractérisées en ce que les segments d'ADN amplifiés par IRS-PCR ont pour source des hybrides somatiques rongeur/homme monochromosomiques.

3) Sondes selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisées en ce que lesdites sondes sont spécifiques de chromosome humain.

4) Sondes selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que les segments d'ADN sont davantage représentés dans un type de bandes cytogénétiques.

5) Sondes selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisées en ce que les segments d'ADN sont davantage représentés dans les bandes R.

6) Sondes selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisées en ce que les amorces spécifiques utilisées comprennent ou sont les amorces de séquences :

- SEQ ID No 1 pour l'amorce spécifique des séquences d'ADN Alu,
- SEQ ID Nos 2 et 3 pour l'amorce spécifique des séquences d'ADN LINE.

7) Sondes selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisées en ce que les sondes sont issues d'un mélange de deux produits d'amplification IRS-PCR composé de :

- produit d'amplification PCR obtenu par l'utilisation de l'amorce spécifique des séquences d'ADN Alu,
- produit d'amplification PCR obtenu par l'utilisation de l'amorce spécifique des séquences d'ADN Alu et de l'amorce spécifique des séquences d'ADN LINE.

8) Sondes selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisées en ce que les segments d'ADN sont marqués directement ou indirectement par les techniques de fluorescence.

9) Sondes ADN selon la revendication 8 caractérisées en ce que les segments d'ADN sont marqués par au moins un fluorophore choisi parmi l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), le rouge

Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650.

10) Ensemble de sondes destinées au marquage des chromosomes humains, caractérisées en ce qu'il contient des sondes selon l'une des revendications 1 à 9 pour chacun des chromosomes humains ou pour un certain nombre d'entre eux.

11) Procédé de production de sondes destiné au marquage de chromosomes humains, caractérisé en ce que ledit procédé comprend le mélange de deux produits d'amplification obtenus par deux amplifications IRS-PCR à partir desdits chromosomes en utilisant d'une part des amorces PCR spécifiques des séquences d'ADN Alu et LINE, et d'autre part des amorces PCR spécifiques des séquences d'ADN Alu.

12) Sondes destinées au marquage de chromosomes humains obtenues par un procédé selon la revendication 11.

13) Procédé de FISH multicolore, caractérisé en ce qu'on utilise pour sa mise en œuvre des sondes selon l'une des revendications 1 à 9 ou 12 ou un ensemble de sondes selon la revendication 10.

20

14) Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que les sondes d'ADN sont marquées par des fluorophores et en ce que chaque fluorophore de longueur d'onde d'absorption et d'émission spécifique est associé à un couple de filtres optiques, un pour l'absorption et un pour l'émission, ledit procédé utilisant des fluorophores et des couples de filtres choisis parmi le groupe suivant :

25 a) le fluorophore FITC ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 494 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 517 nm associé à un filtre à l'excitation de type 490DF30 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 530DF30 (Omega Optical),

b) le fluorophore Cy3 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 554 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 568 nm associé à un filtre à l'excitation de type 546DF10 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 570DF10 (Omega Optical),

30 c) le fluorophore TR ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 593 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 613 nm associé à un filtre à l'excitation de type 590DF10 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 615DF10 (Omega Optical),

d) le fluorophore Cy5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 652 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 670 nm associé à un filtre à l'excitation de type 650DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 670DF10 (Omega Optical),

35

e) le fluorophore Cy7 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 743 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 767 nm associé à un filtre à l'excitation de type 740DF25 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 780EFLP (Omega Optical),

5 f) le fluorophore Cy5,5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 675 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 694 nm associé à un filtre à l'excitation de type 680DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 700EFLP (Omega Optical),

g) le fluorophore Bodipy 630/650 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 632 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 658 nm associé à un filtre à l'excitation de type 630DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 650DF10 (Omega Optical).

10

15) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que les filtres optiques présentent les qualités suivantes :

- ils sont de type 6 cavités,
- ils ont une ADI de 0°;
- 15 - ils ont une tolérance $\lambda_0 \pm 20\%$ de FWHM,
- ils ont une tolérance sur FWHM de $\pm 20\%$ de FWHM,
- ils ont une réjection hors bande passante OD5 de UV à 1200 nm
- ils ont une courbe de transmission $T \geq 50\%$ à λ_0 .

20 16) Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que les filtres optiques présentent en outre les caractéristiques suivantes :

- ils ont un diamètre utile centré supérieur à 21 mm,
- ils ont une épaisseur ≤ 7 mm.

25 17) Procédé selon l'une des revendications 13 à 16, caractérisé en ce que lesdites sondes sont utilisées pour l'étude des caryotypes et des caryotypes de réarrangements chromosomiques.

18) Kit de diagnostic caractérisé en ce qu'il comprend au moins des sondes ADN telles que décrites dans les revendications 1 à 9 ou 12 ou un ensemble de sondes selon la revendication 10.

30

19) Kit selon la revendication 18, caractérisé en ce que les sondes d'ADN sont marquées par des fluorophores et en ce que chaque fluorophore de longueur d'onde d'absorption et d'émission spécifique est associé à un couple de filtres optiques, un pour l'absorption et un pour l'émission, ledit kit utilisant des fluorophores et des couples de filtres choisis parmi le groupe suivant :

35 a) le fluorophore FITC ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 494 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 517 nm associé à un filtre à l'excitation de type 490DF30 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 530DF30 (Omega Optical),

b) le fluorophore Cy3 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 554 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 568 nm associé à un filtre à l'excitation de type 546DF10 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 570DF10 (Omega Optical),

5 c) le fluorophore TR ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 593 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 613 nm associé à un filtre à l'excitation de type 590DF10 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 615DF10 (Omega Optical),

d) le fluorophore Cy5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 652 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 670 nm associé à un filtre à l'excitation de type 650DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 670DF10 (Omega Optical),

10 e) le fluorophore Cy7 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 743 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 767 nm associé à un filtre à l'excitation de type 740DF25 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 780EFLP (Omega Optical),

f) le fluorophore Cy5,5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 675 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 694 nm associé à un filtre à l'excitation de type 680DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 700EFLP (Omega Optical),

15 g) le fluorophore Bodipy 630/650 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 632 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 658 nm associé à un filtre à l'excitation de type 630DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 650DF10 (Omega Optical).

20 20) Combinaison de fluorophores caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 3 des fluorophores sont choisis parmi l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650.

21) Combinaison selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'elle comprend au moins 4
25 des fluorophores choisis parmi l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650.

22) Combinaison selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'elle comprend au moins 5 des fluorophores choisis parmi l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine
30 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650.

23) Combinaison selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'elle comprend au moins 6 des fluorophores choisis parmi l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine
3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 5,5 (Cy5,5), la cyanine 7 (Cy7), le Bodipy 630/650.

24) Combinaison selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'elle comprend les 5 fluorophores suivants : l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC), le rouge Texas (TR), la cyanine 3 (Cy3), la cyanine 5 (Cy5), la cyanine 7 (Cy7).

5 25) Combinaison de fluorophores associés à un couple de filtres optiques, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 1 fluorophore associé à un couple de filtres optiques choisi parmi :

a) le fluorophore FITC ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 494 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 517 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 490DF30 (Omega Optical) et à l'émission de type 530DF30 (Omega Optical),

10 b) le fluorophore Cy3 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 554 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 568 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 546DF10 (Omega Optical) et à l'émission de type 570DF10 (Omega Optical),

c) le fluorophore TR ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 593 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 613 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 590DF10 (Omega Optical) et à l'émission de type 615DF10 (Omega Optical),

15 d) le fluorophore Cy5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 652 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 670 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 650DF20 (Omega Optical) et à l'émission de type 670DF10 (Omega Optical),

e) le fluorophore Cy7 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 743 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 767 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 740DF25 et à l'émission de type 780EFLP,

f) le fluorophore Cy5,5 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 675 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 694 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 680DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 700EFLP (Omega Optical),

25 g) le fluorophore Bodipy 630/650 ayant une longueur d'onde maximale d'absorption de 632 nm et une longueur d'onde maximale d'émission de 658 nm est couplé à un filtre à l'excitation de type 630DF20 (Omega Optical) et à un filtre à l'émission de type 650DF10 (Omega Optical).

30 26) Combinaison selon l'une des revendications 20 à 25, caractérisée en ce qu'elle est comprise dans un kit de diagnostic FISH multicolore.

27) Combinaison selon l'une des revendications 20 à 25, caractérisée en ce qu'elle est utilisée pour marquer une entité choisie parmi les polypeptides, les anticorps, les acides nucléiques, les phospholipides, les acides gras, les dérivés stéroles, les membranes, les organelles et les macromolécules biologiques

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> GENSET

<120> SONDES FLUORESCENTES DE PEINTURE CHROMOSOMIQUE

<130> 340 291/D.17757/PM

<150> FR 98/12957

<151> 1998-10-15

<160> 3

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> primer_bind

<222> 1..20

<223> primer PCR Alu

<400> 1

CCACTGCACT CCAGCCTGGG

20

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> primer_bind

<222> 1..30

<223> primer PCR LINE

<400> 2

CATGGCACAT GTATACATAT GTAACAAACC

30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> primer_bind

<222> 1..30

<223> primer PCR LINE

<400> 3

CATGGCACAT GTATACATAT GTAAC TAACC

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02517

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68 G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WILGENBUS, KLAUS KASIMIR ET AL: "IRS-long range (LR) PCR: a simple method for efficient amplification of human genomic DNA from complex sources" METHODS MOL. CELL. BIOL. (1995), VOLUME DATE 1994-1995, 5(4), 214-21, XP002114358	1-12, 18
Y	the whole document	13-17, 19
X	SPEICHER M R ET AL: "KARYOTYPING HUMAN CHROMOSOMES BY COMBINATORIAL MULTI-FLUOR FISH" NATURE GENETICS, vol. 12, January 1996 (1996-01), pages 368-375, XP002900459 ISSN: 1061-4036	20-22, 25-27
Y	cited in the application the whole document	13-17, 19



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 March 2000

Date of mailing of the international search report

22/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Reuter, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte .ional Application No
PCT/FR 99/02517

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEDBETTER S A ET AL: "RAPID IOSLATION OF DNA PROBES WITHIN SPECIFIC CHROMOSOME REGIONS BY INTERSPERSED REPETITIVE SEQUENCE POLYMERASE CHAIN REACTION" GENOMICS, vol. 6, 1990, pages 475-481, XP002914387 ISSN: 0888-7543 the whole document ---	1-4, 18
X	WO 98 38333 A (MULLER STEFAN ;WIENBERG JOHANNES FRIEDERICH (DE); UNIV CAMBRIDGE T) 3 September 1998 (1998-09-03) page 13-17 ---	20-24
X	US 5 817 462 A (BUCKWALD ROBERT A ET AL) 6 October 1998 (1998-10-06) column 40-54 column 1-6 ---	20, 21
A	LICHTER P ET AL: "FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION WITH ALU AND L1 POLYMERASE CHAIN REACTION PROBES FOR RAPID CHARACTERIZATION OF HUMAN CHROMOSOMES IN HYBRID CELL LINES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 87, no. 17, 1 September 1990 (1990-09-01), pages 6634-6638, XP000310538 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document ---	1-27
A	LENGAUER ET AL.: "Painting human chromosomes with probes generated from hybrid cell lines by PCR with Alu and L1 primers" HUMAN GENETICS, vol. 86, 1990, pages 1-6, XP002114359 the whole document ---	1-27
A	ROMANA ET AL.: "A simple method for prenatal diagnosis of trisomy 21 on uncultured amniocytes" EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 1, no. 3, 1993, pages 245-251, XP002114368 cited in the application page 246 --- -/--	6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No
PCT/FR 99/02517

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SCHROECK E ET AL: "MULTICOLOR SPECTRAL KARYOTYPING OF HUMAN CHROMOSOMES" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, vol. 273, 26 July 1996 (1996-07-26), pages 494-497, XP002900460 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document -----</p>	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02517

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9838333 A	03-09-1998	AU 6307598 A GB 2325302 A	18-09-1998 18-11-1998
US 5817462 A	06-10-1998	US 5936731 A US 5784162 A US 5539517 A AU 2730597 A EP 0896631 A WO 9740191 A US 5719024 A US 5856871 A US 5835214 A US 5798262 A US 6018587 A US 5912165 A US 5906919 A EP 0832417 A JP 11503239 T WO 9722848 A EP 0830564 A JP 11500832 T WO 9721979 A US 6007996 A US 5991028 A EP 0767361 A	10-08-1999 21-07-1998 23-07-1996 12-11-1997 17-02-1999 30-10-1997 17-02-1998 05-01-1999 10-11-1998 25-08-1998 25-01-2000 15-06-1999 25-05-1999 01-04-1998 23-03-1999 26-06-1997 25-03-1998 19-01-1999 19-06-1997 28-12-1999 23-11-1999 09-04-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de internationale No
PCT/FR 99/02517

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12Q1/68 G01N33/58		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12Q G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WILGENBUS, KLAUS KASIMIR ET AL: "IRS-long range (LR) PCR: a simple method for efficient amplification of human genomic DNA from complex sources" METHODS MOL. CELL. BIOL. (1995), VOLUME DATE 1994-1995, 5(4), 214-21, XP002114358	1-12, 18
Y	le document en entier	13-17, 19
X	SPEICHER M R ET AL: "KARYOTYPING HUMAN CHROMOSOMES BY COMBINATORIAL MULTI-FLUOR FISH" NATURE GENETICS, vol. 12, janvier 1996 (1996-01), pages 368-375, XP002900459 ISSN: 1061-4036	20-22, 25-27
Y	citée dans la demande	
	le document en entier	13-17, 19
--- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
° Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 15 mars 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 22/03/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Reuter, U

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: Je internationale No

PCT/FR 99/02517

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LEDBETTER S A ET AL: "RAPID ISOLATION OF DNA PROBES WITHIN SPECIFIC CHROMOSOME REGIONS BY INTERSPERSED REPETITIVE SEQUENCE POLYMERASE CHAIN REACTION" GENOMICS, vol. 6, 1990, pages 475-481, XP002914387 ISSN: 0888-7543 le document en entier	1-4, 18
X	WO 98 38333 A (MULLER STEFAN ; WIENBERG JOHANNES FRIEDERICH (DE); UNIV CAMBRIDGE T) 3 septembre 1998 (1998-09-03) page 13-17	20-24
X	US 5 817 462 A (BUCKWALD ROBERT A ET AL) 6 octobre 1998 (1998-10-06) colonne 40-54 colonne 1-6	20, 21
A	LICHTER P ET AL: "FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION WITH ALU AND L1 POLYMERASE CHAIN REACTION PROBES FOR RAPID CHARACTERIZATION OF HUMAN CHROMOSOMES IN HYBRID CELL LINES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 87, no. 17, 1 septembre 1990 (1990-09-01), pages 6634-6638, XP000310538 ISSN: 0027-8424 cité dans la demande le document en entier	1-27
A	LENGAUER ET AL.: "Painting human chromosomes with probes generated from hybrid cell lines by PCR with Alu and L1 primers" HUMAN GENETICS, vol. 86, 1990, pages 1-6, XP002114359 le document en entier	1-27
A	ROMANA ET AL.: "A simple method for prenatal diagnosis of trisomy 21 on uncultured amniocytes" EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 1, no. 3, 1993, pages 245-251, XP002114368 cité dans la demande page 246	6

	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der le Internationale No

PCT/FR 99/02517

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités. avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>SCHROECK E ET AL: "MULTICOLOR SPECTRAL KARYOTYPING OF HUMAN CHROMOSOMES" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, vol. 273, 26 juillet 1996 (1996-07-26), pages 494-497, XP002900460 ISSN: 0036-8075 cité dans la demande le document en entier -----</p>	1-27

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De de Internationale No

PCT/FR 99/02517

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9838333 A	03-09-1998	AU 6307598 A	18-09-1998
		GB 2325302 A	18-11-1998
US 5817462 A	06-10-1998	US 5936731 A	10-08-1999
		US 5784162 A	21-07-1998
		US 5539517 A	23-07-1996
		AU 2730597 A	12-11-1997
		EP 0896631 A	17-02-1999
		WO 9740191 A	30-10-1997
		US 5719024 A	17-02-1998
		US 5856871 A	05-01-1999
		US 5835214 A	10-11-1998
		US 5798262 A	25-08-1998
		US 6018587 A	25-01-2000
		US 5912165 A	15-06-1999
		US 5906919 A	25-05-1999
		EP 0832417 A	01-04-1998
		JP 11503239 T	23-03-1999
		WO 9722848 A	26-06-1997
		EP 0830564 A	25-03-1998
		JP 11500832 T	19-01-1999
		WO 9721979 A	19-06-1997
		US 6007996 A	28-12-1999
		US 5991028 A	23-11-1999
		EP 0767361 A	09-04-1998